

発表番号 62 (0330)

プロスタシンの発現調節機構の解明および 食塩感受性高血圧症治療への応用

助成研究者：北村健一郎（熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科）

共同研究者：富田 公夫（熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科）

遺伝性食塩感受性高血圧症の1つである Liddle 症候群において腎臓皮質集合尿細管に存在する上皮型ナトリウムチャンネル (ENaC) の gain-of-function mutation が発見されたことなどから腎臓におけるナトリウム再吸収と高血圧症の強い因果関係が示唆されている。1997年に Vallet らは A6 細胞からトリプシン様セリンプロテアーゼである Channel-activating protease (CAP-1) を単離し、*Xenopus Oocyte* 上に ENaC と共発現させると ENaC 活性が亢進することを報告した。私たちは CAP-1 の mammalian homologue のクローニングに着手し、セリンプロテアーゼのプロスタシンをラット腎臓 cDNA ライブラリーから単離した。プロスタシンはラット腎臓尿細管では ENaC が局在する CCD、OMCD、IMCD に存在することが明らかになった。*Xenopus Oocyte* に ENaC と共発現させるとアミロライド感受性ナトリウム電流を 2~5 倍増加させることも証明した。さらにアルドステロンが腎臓においてプロスタシンの発現を増強して ENaC を介したナトリウムの再吸収を増加させることも証明した。これらの知見はプロスタシンが食塩感受性高血圧症の発症因子の 1 つである可能性を強く示唆するものである。

本研究では私たちは高血圧モデルラットである Dahl 食塩感受性 (DS)・非感受性 (DR) ラットを用いて血圧の変化と尿中プロスタシン分泌量の変化について検討した。DS ラットと DR ラットの尿中プロスタシン排泄量を比較したところ、7 週齢の時点では DR ラットにおいて尿中プロスタシン排泄はほとんど検出できなかったが、DS ラットではプロスタシン排泄量が有意に増加していた。さらに私たちはプロスタシンの発現抑制がナトリウムの再吸収を抑制し、降圧利尿効果につながると仮説をたて、セリンプロテアーゼ阻害薬をラットに投与し、プロスタシンの発現量の変化、尿中ナトリウム排泄量の変化、血圧の変化等を検討した。その結果、メシル酸ナファモスタットがプロスタシンの発現を抑制し、尿中ナトリウム排泄を促進させる作用があることが明らかとなった。

これらの知見は、プロスタシンが高血圧発症に関与している可能性を強く示唆するとともに、プロスタシン発現抑制薬が新規作用機序の降圧利尿剤開発へつながる可能性も示唆するものであると考えられた。

4

助成番号 0330

プロスタシンの発現調節機構の解明および食塩感受性高血圧症治療への応用

助成研究者：北村健一郎 (熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科)

共同研究者：富田 公夫 (熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科)

【研究目的】

自然発症高血圧ラットの腎臓を正常ラットに移植すると、正常ラットに高血圧が発症することや、ヒトの腎移植においてもドナーが高血圧症または高血圧素因を持ち合わせていた場合、レシピエントに高血圧を発症する頻度が高いことなどから高血圧症の成因として腎臓の果たす役割は重要視されている。また、遺伝性食塩感受性高血圧症の1つである Liddle 症候群において腎臓皮質集合尿細管に存在する上皮型ナトリウムチャンネル (ENaC) の gain-of-function mutation が発見されたことから腎臓におけるナトリウム再吸収と高血圧症の強い因果関係が示唆されている。ENaC は腎臓、肺、大腸、汗腺、味蕾などの上皮細胞に存在し、ナトリウムの再吸収を担っている。ENaC は α 、 β 、 γ の3つのサブユニットが 2α 、 1β 、 1γ の4量体を形成して1つのチャンネルを構成している。この ENaC はアルドステロンや抗利尿ホルモン、インスリンなどのホルモンにより調節を受け、腎臓でのナトリウム再吸収量の最終的な調節を行っている[1-3]。1997年に Vallet らはアフリカツメガエルの尿細管細胞 (A6 cell) からトリプシン様セリンプロテアーゼである Channel-activating protease (CAP-1) を単離し、*Xenopus* Oocyte 上に ENaC と CAP-1 を共発現させると ENaC の活性が亢進することを報告した。アフリカツメガエルでのこの CAP-1 の組織分布は ENaC のそれとほぼ類似しており、ENaC と CAP-1 の相互作用の生理学的な意義が推測された[4]。

私たちは CAP-1 の mammalian homologue のクローニングに着手し、これまでにセリンプロテアーゼのプロスタシンをラット腎臓 cDNA ライブラリーから単離した。このプロスタシンは ENaC と類似した臓器分布を示し、ラット腎臓尿細管では ENaC が局在する CCD、OMCD、IMCD に存在することが明らかになった。*Xenopus* Oocyte に ENaC とプロスタシンを共発現させるとアミロライド感受性ナトリウム電流を 2~5 倍増加させることも証明した[5]。さらにナトリウム代謝においてもっとも重要なホルモンの1つであるアルドステロンが腎臓においてプロスタシンの発現を増強して ENaC を介したナトリウムの再吸収を増加させるという新しいナトリウム調節機構を証明した[6]。これらの知見はプロスタシンがナトリウム代謝において生理学的に重要な役割を果たしていること、および食塩感受性高血圧症の発症因子の1つである可能性を強く示唆するものである。

本研究では私たちは高血圧モデルラットである Dahl 食塩感受性・非感受性ラットを用いて

血圧の変化と尿中プロスタシン排泄量の変化について検討した。さらに私たちはプロスタシンの発現抑制、またはプロスタシンの活性抑制をすることがナトリウムの再吸収を抑制し、降圧利尿効果につながると仮説をたて、各種セリンプロテアーゼ阻害薬をラットに投与し、プロスタシンの発現量の変化、尿中ナトリウム排泄量の変化、血圧の変化等を検討した。

【研究方法】

・ Dahl 食塩感受性・非感受性ラットにおける尿中プロスタシン排泄量の検討

1. 5週齢の Dahl 食塩感受性・非感受性ラットに 8%食塩食および 0.3%食塩食を与え、連日蓄尿し、血圧と尿中プロスタシン排泄量を測定した。
2. Dahl 食塩感受性ラットに 8%食塩食を与え、同時に Ca 拮抗薬または ACE 阻害薬を投与して血圧を十分に下げた状態で、尿中プロスタシン排泄量を測定した。

・ メシル酸ナファモスタットのプロスタシン発現に対する影響

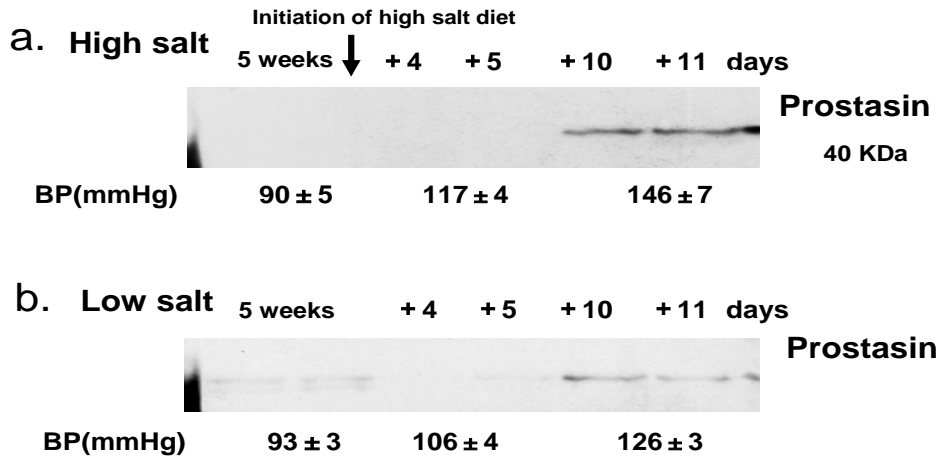
1. マウス皮質集合尿細管細胞 (M-1 cell) にメシル酸ナファモスタットを投与し、プロスタシンの発現に対する影響をノーザンブロット法およびウエスタンブロット法を用いて検討した。
2. メシル酸ナファモスタットの代謝産物 (AN、PGBA) を用いて 1.と同様の検討を行った。
3. SD ラットにメシル酸ナファモスタットおよびその代謝産物を持続静注し、尿中プロスタシン排泄量と尿中ナトリウム排泄量を測定する。

【研究結果】

・ Dahl 食塩感受性・非感受性ラットにおける尿中プロスタシン排泄量の検討

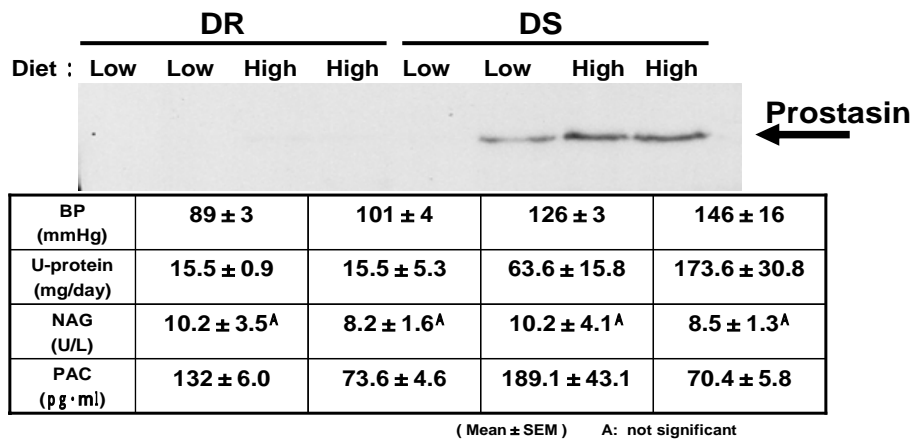
1. Dahl 食塩感受性ラットにおいて尿中プロスタシンは 6週 + 3日目より検出可能となった。8%食塩食および 0.3%食塩食においては明らかな尿中プロスタシン排泄量の違いは認められなかった。

Time course of urinary prostatic excretion in DS rats



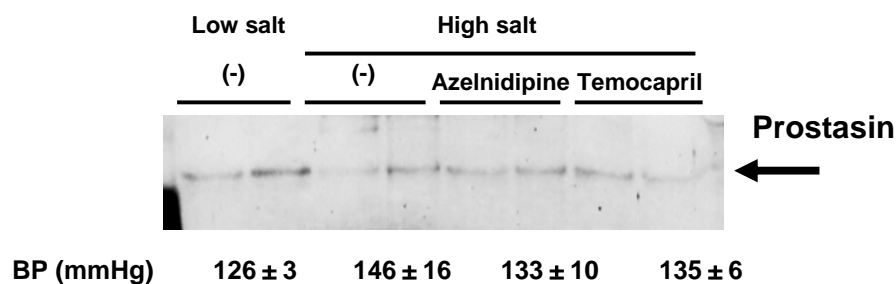
Dahl 食塩感受性ラットと非感受性ラットの尿中プロスタシン排泄量を比較したところ、7 週齢の時点では食塩非感受性ラットにおいて尿中プロスタシン排泄はほとんど検出できなかったが、食塩感受性ラットでは尿中プロスタシン排泄量が有意に増加していた。

Comparison of urinary prostatic excretion in DS and DR rats at 7 weeks old



2. Dahl 食塩感受性ラットに 8%食塩食を与え、同時に Ca 拮抗薬または ACE 阻害薬を投与して血圧を十分に下げた状態で、尿中プロスタシン排泄量を測定したところ、尿中プロスタシン排泄量は各種降圧剤の影響は受けなかった。

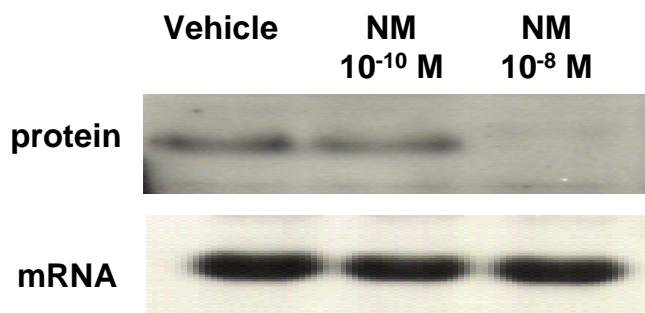
Effect of anti-hypertensive drugs on urinary prostasin excretion in DS rats



・メシル酸ナファモスタットのプロスタシン発現に対する影響

1. マウス皮質集合尿管細胞 (M-1 cell) にメシル酸ナファモスタットを 10^{-10} および 10^{-8} M 投与し、24 時間後のプロスタシンの発現に対する影響をノーザンプロット法およびウエスタンプロット法を用いて検討した。 10^{-10} M のメシル酸ナファモスタットはプロスタシンの mRNA およびタンパク質発現には影響を与えなかった。 10^{-8} M のメシル酸ナファモスタットはプロスタシンのタンパク質発現を抑えたが、mRNA 発現には影響を与えなかった。

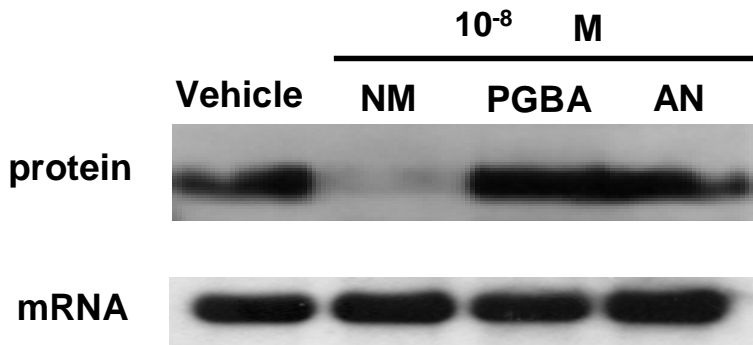
Effect of Nafamostat Mesilate on prostasin expression in M-1 cells



2. メシル酸ナファモスタットの代謝産物 (AN、PGBA) を用いて同様の検討を行ったところ、セリンプロテアーゼインヒビター活性のあるメシル酸ナファモスタットの

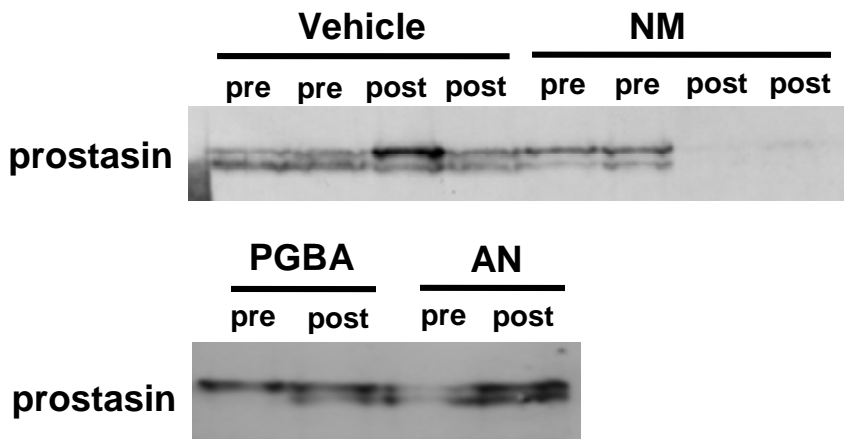
みがプロスタシンタンパク質の発現を抑制した。

Effect of NM, PGBA, and AN on prostasin secretion in M-1 cells



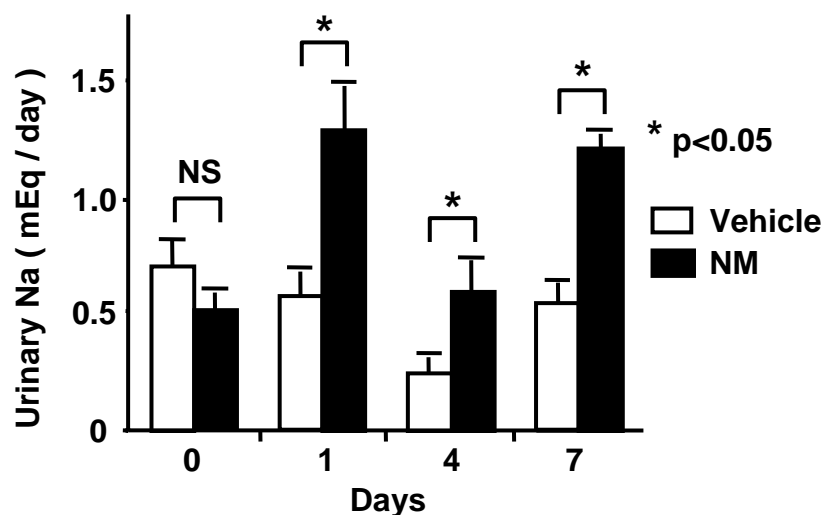
3. SD ラットにメシル酸ナファモスタットおよびその代謝産物を持続静注し、尿中プロスタシン排泄量と尿中ナトリウム排泄量を測定した。メシル酸ナファモスタットの投与により、尿中プロスタシン排泄は激減した。メシル酸ナファモスタットの代謝産物の投与は尿中プロスタシン排泄には影響を与えなかった。

Effect of serine protease inhibitor on Urinary prostasin excretion in rats



尿中ナトリウム排泄量はメシル酸ナファモスタット投与により、有意に増加していた。

Effect of NM on urinary sodium excretion in rats

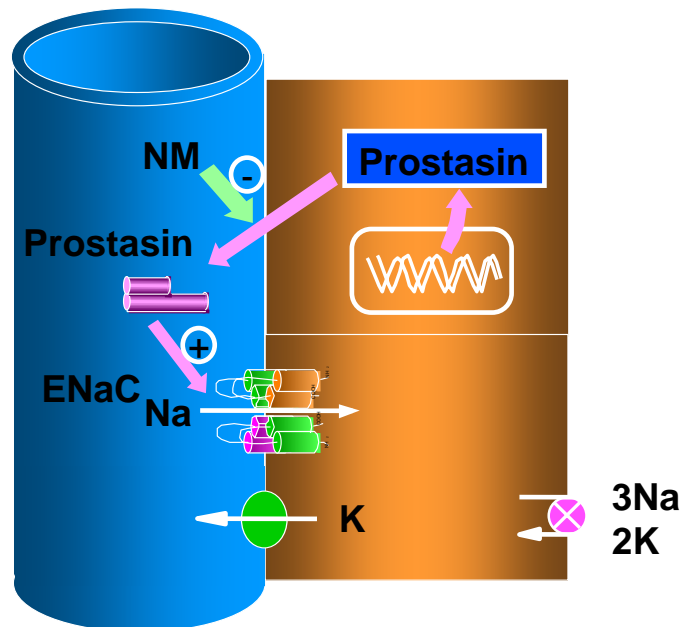


【考察】

これまでに私たちはプロスタシンが ENaC を活性化することを報告してきたが、この現象の生理学的意義は不明だった。しかし、今回の Dahl 食塩感受性高血圧ラットを用いた検討から、Dahl 食塩感受性高血圧ラットの高血圧発症機序にプロスタシンが関与している可能性が示唆された。すなわち、食塩感受性ラットでは尿中プロスタシンの発現が亢進しているため ENaC が活性化された状態にあり、そこへ高食塩負荷がかかるとナトリウムの再吸収亢進から体液貯留へと傾き、高血圧が発症するという機序が考えられる。食塩非感受性ラットでは、プロスタシンの尿中プロスタシンの発現量が低いため、高血圧が惹起されない可能性が推測される。Dahl 食塩感受性高血圧ラットの高血圧発症機序は単一ではないと考えられるが、その機序の1つとしてプロスタシンの関与が疑われる。

今回のもう1つの検討から、セリンプロテアーゼ阻害剤のメシル酸ナファモスタットがプロスタシンの発現を抑制して、ナトリウム利尿をきたすことが証明された。このことはメシル酸ナファモスタットを临床上使用した際に、ときに生じる低ナトリウム血症や高カリウム血症などの副作用を説明するものであり[7-9]、病態生理学的な意義は大きいと考えられ、ひいてはプロスタシンの生理学的重要性を裏付けるものである。さらに今回の知見は、メシル酸ナファモスタットなどのセリンプロテアーゼ阻害剤がプロスタシンの発現を抑制することで降圧利尿剤として働きうることをも示唆している。今後、新規作用機序による降圧利尿薬の開発にもつながる可能性を示唆している。

Hypothetical mechanism of nafamostat mesilate-induced hyponatremia / hyperkalemia



【今後の課題】

ヒトの食塩感受性高血圧症におけるプロスタシンの病態生理学的意義の解明がまだなされていないので、今後の解明が急がれる。また、新規作用機序による降圧利尿薬の開発・スクリーニングを検討していく必要がある。

【文献】 Reference List

1. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC: Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367:463-467, 1994
2. Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC: Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 361:467-470, 1993
3. Garty H, Palmer LG: Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev.* 77:359-396, 1997
4. Vallet V, Chraibi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC: An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 389:607-610, 1997

5. Adachi M, Kitamura K, Miyoshi T, Narikiyo T, Iwashita K, Shiraishi N, Nonoguchi H, Tomita K: Activation of epithelial sodium channels by prostaticin in *Xenopus* oocytes. *J.Am.Soc.Nephrol.* 12:1114-1121, 2001
6. Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M, Miyoshi T, Iwashita K, Shiraishi N, Nonoguchi H, Chen LM, Chai KX, Chao J, Tomita K: Regulation of prostaticin by aldosterone in the kidney. *J.Clin.Invest* 109:401-408, 2002
7. Muto S, Imai M, Asano Y: Mechanisms of the hyperkalaemia caused by nafamostat mesilate: effects of its two metabolites on Na⁺ and K⁺ transport properties in the rabbit cortical collecting duct. *Br.J.Pharmacol.* 111:173-178, 1994
8. Muto S, Imai M, Asano Y: Effect of nafamostat mesilate on Na⁺ and K⁺ transport properties in the rabbit cortical collecting duct. *Br.J.Pharmacol.* 109:673-678, 1993
9. Muto S, Imai M, Asano Y: Mechanisms of hyperkalemia caused by nafamostat mesilate. *Gen.Pharmacol.* 26:1627-1632, 1995

Regulation of prostatic expression and its application for the treatment of salt-sensitive hypertension

Kenichiro Kitamura and Kimio Tomita

Department of Nephrology,

Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences

Summary

Identification of gain-of-function mutation in epithelial sodium channel (ENaC) in Liddle's syndrome patients, a hereditary form of salt-sensitive hypertension, indicates the importance of the sodium reabsorption through the kidney in the pathogenesis of salt-sensitive hypertension. In 1997, Vallet et al isolated a channel-activating protease (CAP-1), a trypsin-like serine protease, from A6 cell line and demonstrated that co-expression of CAP-1 and ENaC in *Xenopus* oocytes increased ENaC activity. We isolated a serine protease prostaticin, a mammalian CAP-1 homologue, from rat kidney cDNA library. We found that prostaticin is expressed in CCD, OMCD, and IMCD in the kidney where the ENaC is also expressed and that co-expression of prostaticin and ENaC increased the amiloride-sensitive sodium current in *Xenopus* oocytes. We also demonstrated that aldosterone increases sodium reabsorption through ENaC by increasing the expression of prostaticin. These findings suggest the possibility that prostaticin might be involved in the pathogenesis of the salt-sensitive hypertension.

In the current project, we determined the urinary prostaticin excretion and blood pressure in Dahl salt-sensitive (DS) rats and salt-resistant (DR) rats, a rat model of salt-sensitive hypertension. We found that urinary prostaticin excretion is increased in DS rats compared with DR rats at 7 weeks-old. We also investigated the effect of nafamostat mesilate (NM), a serine protease inhibitor, on prostaticin expression and urinary sodium excretion to determine if inhibition of prostaticin results in an increase in urinary sodium excretion through the inhibition of ENaC. We found that NM inhibits prostaticin expression in the kidney as well as the urinary sodium excretion in rats.

These findings strongly suggest the possibility that prostaticin might be involved in the pathogenesis of the salt-sensitive hypertension and indicate that NM or its derivatives might be a candidate of the new diuretics/anti-hypertensive drugs in the future.